

⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑲ Anmeldenummer: 87890116.4

⑤ Int. Cl.⁴: **A 61 K 39/395**

⑳ Anmeldetag: 21.05.87

③① Priorität: 30.05.86 AT 1457/86

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.12.87 Patentblatt 87/49

④④ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE

⑦① Anmelder: IMMUNO Aktiengesellschaft für
chemisch-medizinische Produkte
Industriestrasse 72
A-1220 Wien (AT)

⑦② Erfinder: Eibl, Johann, Dr.
Gustav Tschermakgasse 2
A-1180 Wien (AT)

Linnau, Yendra, Dr.
Lavendelweg 24
A-1220 Wien (AT)

⑦④ Vertreter: Wolfram, Gustav, Dipl.-Ing.
Schwindgasse 7 P.O. Box 205
A-1041 Wien (AT)

⑤④ Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern.

⑤⑦ Bei einem Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern in therapeutisch oder prophylaktisch anzuwendenden Immunglobulin-G-hältigen Fraktionen wird zur Erhaltung der vollen Aktivität der Blutprodukte und zur vollständigen Inaktivierung pathogener Viren eine wässrige Lösung einer aus menschlichem Blut gewonnenen Immunglobulin-G-hältigen Fraktion bei einer Temperatur von 4 bis 50°C und bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,5 mit neutralen Hydrolasen behandelt.

EP 0 247 998 A2

Beschreibung

Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern in therapeutisch oder prophylaktisch anzuwendenden Immunglobulin-G-hältigen Blutfraktionen, gegebenenfalls unter Anwendung von erhöhter Temperatur.

Es ist eine umfangreiche Literatur vorhanden, die sich mit der Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern in Blutprodukten befaßt. Die verschiedenen Verfahren umfassen u.a.:

- Erhitzen der Blutprodukte in wässriger Lösung, gegebenenfalls unter Zusatz stabilisierender Substanzen,
- Behandeln der Blutprodukte mit organischen Lösungsmitteln,
- Erhitzen der Blutprodukte in trockenem Zustand.

Das Bestreben bei diesen Inaktivierungsverfahren geht dahin, die potentielle Infektiosität der Präparationen aufzuheben, ihre biologische Aktivität aber weitgehend zu erhalten. Dieses Ziel wurde bisher nicht in zufriedenstellender Weise erreicht. Vor allem sind diese Verfahren bei Immunglobulin-hältigen Lösungen nicht bzw. schlecht anwendbar.

Im einzelnen sind zum Stand der Technik beispielsweise die folgenden Literaturstellen anzuführen:
Die europäische Patentanmeldung 0 139 975 betrifft ein Verfahren zur Pasteurisierung von Humanplasma, wobei eine Plasmalösung in Gegenwart von Calciumionen und von Saccharose auf eine Temperatur bis zu 70°C erhitzt wird.

Die EP-B1 - 0 053 338 beschreibt ein Verfahren zur Inaktivierung von Hepatitis-Viren in Faktor IX und X enthaltenden Präparationen, wobei eine Erwärmung der wässrigen Lösung eines Blutpräparates in Gegenwart von Calciumionen und gegebenenfalls einer Aminosäure und/oder eines Saccharides oder Zuckerkalkoholes bei Temperaturen von bis zu 100°C vorgenommen wird.

In der EP-A2 - 0 035 204 wird ein Verfahren zur Inaktivierung von wässrigen Proteinlösungen, die Faktor VIII, Fibrinogen, Globulin, Fibrinogen und andere Proteine enthalten können, beschrieben, wobei die Komposition mit einem Polyol gemischt und die Mischung auf eine Temperatur von 60 bis 75°C erhitzt wird.

In der EP-A2 - 0 077 870 ist ein Inaktivierungsverfahren beschrieben, bei welchem eine wässrige, Faktor VIII enthaltende Lösung mit Aminosäuren, Monosacchariden, Oligosacchariden, Zuckerkalkoholen und Kohlenwasserstoff- oder Hydroxylkohlenwasserstoffcarbonsäuren mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen auf eine Temperatur von 50 bis 80°C erhitzt wird.

In der PCT-Anmeldung WO 83/04371 ist ein Verfahren zum Inaktivieren von Hepatitis-Viren beschrieben, wobei eine das Virus enthaltende Präparation bei einer Temperatur von 4 bis 40°C mit einem Halogenkohlenwasserstoff, insbesondere Chloroform, behandelt wird.

Die veröffentlichte PCT-Anmeldung WO 82/03871 beschreibt ein Verfahren zur Behandlung von Blutgerinnungsenzyme enthaltenden Zubereitungen, wobei diese zur Inaktivierung vorhandener infektiöser Viren im trockenen Zustand, gegebenenfalls unter Zusatz von Stabilisatoren, wie z.B. Aminosäuren und/oder Zucker, erhitzt werden; als trockener Zustand wird ein solcher mit weniger als 5 Gew.-% (0,05) Wasser definiert.

Im japanischen Dokument 51-118825 ist ein Verfahren zur thermischen Stabilisation von IgA (Immunglobulin A) und IgM (Immunglobulin M) beschrieben, wobei durch Hitzebehandlung bei 60°C der Immunglobulin-hältigen Lösung in Gegenwart von neutralen Aminosäuren und Monosacchariden Hepatitis-Viren inaktiviert werden soll.

Schließlich ist noch auf die europäische Patentanmeldung 0 122 909 der Anmelderin zu verweisen, worin ein Verfahren zur Herstellung einer intravenös verabreichbaren Immunglobulin-G-hältigen Fraktion beschrieben ist. Bei diesem Verfahren wird eine Immunglobulin-G-hältige Fraktion mit an wasserunlösliches Trägermaterial gebundenen Pankreasenzymen behandelt, mit dem Ziel, Verunreinigungen, die eine vasoaktive bzw. leukopenische Wirkung und damit Unverträglichkeitsreaktionen zur Folge haben, zu entfernen. Über Inaktivierungswirkungen gegenüber Krankheitserregern wird in dem Dokument nichts berichtet.

Obwohl, wie aus dem referierten Stand der Technik ersichtlich ist, eine große Anzahl von Inaktivierungsverfahren vorgeschlagen worden ist, haben alle diese Verfahren gewisse Nachteile, wie nicht zufriedenstellende Ausbeute und/oder Reduktion der biologischen Wirksamkeit oder keine vollständige Inaktivierung aller in Frage kommenden Viren; bzw. sind sie für Immunglobulin-G-hältige Präparationen in flüssiger Phase nicht anwendbar, ohne einen der genannten Nachteile aufzuweisen.

Die Erfindung bezweckt die Vermeidung dieser Nachteile bzw. Schwierigkeiten und stellt sich die Aufgabe, ein Inaktivierungsverfahren für Immunglobulin-G-hältige Präparationen zur Verfügung zu stellen, bei welchem die Sicherheit gegeben ist, daß bei deren Applikation keine pathogenen Viren mehr enthalten sind, und die Aktivität der Blutprodukte ausreichend voll erhalten bleibt.

Die Erfindung, mit der diese Aufgabe gelöst wird, besteht bei einem Verfahren der eingangs definierten Art darin, daß eine wässrige Lösung einer aus menschlichem Blut gewonnenen Immunglobulin-G-hältigen Fraktion bei einer Temperatur von 4 bis 50°C und bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,5 mit neutralen Hydrolasen behandelt wird.

Als neutrale Hydrolase können ein oder mehrere Enzyme aus der Gruppe der Peptidhydrolasen, wie Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Carboxypeptidasen, verwendet werden.
Bei Anwendung der Erfindung zur Herstellung von Immunglobulin-G-Präparationen wird bevorzugt nach der

Inaktivierung das bzw. die Enzyme aus der Lösung abgetrennt und das behandelte Produkt einer weiteren Reinigung und Konzentrierung unterworfen.

Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird die wässrige Lösung der Immunglobulin-G-hältigen Fraktion mit einer löslichen Hydrolase bei einem pH-Wert von 6,0 bis 8,0, vorzugsweise $7,0 \pm 0,4$, behandelt.

Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird die wässrige Lösung der Immunglobulin-G-hältigen Fraktion mit einer an wasserunlöslichem Trägermaterial gebundenen (immobilisierten) neutralen Hydrolase bei einem pH-Wert von 5,5 bis 8,5 behandelt.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Behandlung der Immunglobulin-G-hältigen Fraktion bei erhöhter Temperatur während einer Dauer von 1 Stunde bis 36 Tage durchgeführt.

Die Proteinkonzentration der Immunglobulin-G-hältigen Fraktion kann von 0,1 bis 18 Gew. % betragen.

Von den vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zuverlässig inaktiviert werden können, sind besonders Hepatitisviren oder HTLV-III/LAV-Viren (Human T Lymphotropic Virus) hervorzuheben.

Da die notwendigen Untersuchungen über Hepatitis-Virusinaktivierung in Blutprodukten nicht sofort beim Menschen vorgenommen werden können und Schimpansen nur in ungenügender Zahl zur Verfügung stehen, erfolgt erfindungsgemäß die Bewertung der Wirksamkeit der Inaktivierung mit Hilfe von Modellviren.

Das erfindungsgemäße Inaktivierungsverfahren sowie die Herstellung einer Immunglobulin-G-hältigen Präparation unter Anwendung des Verfahrens, die erreichten Wirkungen und die Überlegenheit gegenüber bekannten Verfahren sind in den folgenden Beispielen und Tabellen näher erläutert.

Beispiel 1:

a) Herstellung einer Immunglobulin-G-hältigen Fraktion:

Menschliches Blutplasma wird bei einem pH-Wert von 7,2 und einer Temperatur von -2°C mit 8 % Äthanol versetzt. Nach Abtrennen des Präzipitates wird die Äthanolkonzentration auf 25 % erhöht und gleichzeitig die Temperatur auf -6°C gesenkt. Der Niederschlag, der Immunglobulin-G enthält, wird durch Extraktion mit einem Phosphat-Acetat-Puffer weiter gereinigt und anschließend bei einem pH-Wert von 5,4 und einer Temperatur von -2°C mit 12 % Äthanol versetzt. Der Niederschlag wird verworfen. Die Äthanolkonzentration des Überstandes wird, bei einem pH-Wert von 7,2 und einer Temperatur von -8°C , auf 25 % erhöht. Das ausgefallene pastenförmige Immunglobulin wird gesammelt und das Äthanol durch Dialyse, Gefriertrocknung oder Ultrafiltration entfernt.

Die Immunglobulin-G-hältige Fraktion wird auf einen Proteingehalt von 10 % eingestellt und durch Filtration sterilisiert.

b) Inaktivierung von Vacciniavirus mit immobilisiertem Trypsin:

Das in diesem Beispiel verwendete immobilisierte Trypsin wurde in folgender Weise bereitet:

1 l Sepharose 4 B-Gel (Pharmacia) wurde nach einer Waschung mit 4 l destilliertem Wasser mit 200 g Bromcyan, die in 100 ml Acetonitril gelöst wurden, bei einem pH-Wert von 11,0 versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde durch ein Eisbad gekühlt. Nach Entfernung der flüssigen Phase wurde das Gel mit 800 mg Trypsin (Sigma), das in 1 l 0,2 molarem NaHCO_3 gelöst wurde, versetzt. Das nicht gebundene Trypsin wurde vom Trypsin, das an das Gel gebunden ist, durch Filtrieren getrennt.

Nachdem das immobilisierte Trypsin mit 1 l einer 1 molaren Glycinlösung versetzt wurde, wurde es gründlich mit 0,2 molarer NaHCO_3 -Lösung proteinfrei gewaschen. Schließlich wurde es in 1 l 0,9 %iger NaCl-Lösung suspendiert - es ist gebrauchsfertig für die Inkubation mit einer Immunglobulinfraktion.

10 ml der nach lit.a) erhaltenen Immunglobulinlösung wurden mit 1 ml des wie oben beschriebenen immobilisierten Trypsins und mit 0,5 ml einer Vaccinia Virus Suspension (Vaccinia Virus, ATCC VR-862, Virusstamm Elstree, American Type Culture Collection) versetzt und unter sterilen Bedingungen bei 37°C unter Rühren behandelt.

Eine Vergleichslösung, enthaltend 10 ml der Immunglobulinlösung gemäß a), 1 ml immobilisiertes Trypsin und 0,5 ml virusfreies Medium, wurde zur Bestimmung der IgG Monomeren und der biologischen Aktivität vorbereitet und in gleicher Weise wie die virushältige Lösung (gleiche Temperatur, gleiche Rührdauer) behandelt.

Zu Beginn und nach verschiedenen Zeitintervallen, nämlich nach 24 h, 48 h und 75 h, wurden Proben der virushältigen Lösung entnommen und der Virustiter bestimmt. Dies erfolgte in folgender Weise:

Die virushältige Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 10 seriell verdünnt. Der Titer des Virus wurde durch Bewertung des zytopathischen Effektes auf sensitive Vero-Zellen in der Mikrotiterplatte bestimmt. Die Ergebnisse wurden nach statistischer Behandlung der Auswertung entsprechend der Formel von Reed und Muench als Logarithmus TCID_{50} ausgedrückt (Reed J.L. and H. Muench; Amer.J.Hyg. 27, 493 - 497, (1938)).

Die erhaltenen Virustiter sind aus Tabelle 1 zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß der zu Beginn der Untersuchung vorhandene Virustiter von 2,6 nach 24 h auf 1,0 und nach 48 h auf kleiner als 1,0 gesunken ist.

c) Bestimmung der biologischen Aktivität, u.zw. der Gehalt an Tetanus Antikörper in IE/ml und des Anteiles an IgG Monomeren in virusfreien Proben:

Die Bestimmung der Tetanus Antikörper beruht darauf, daß eine bestimmte Menge an Tetanus Toxin mit

verschiedenen Mengen an Tetanusantitoxin-haltigen Proben gemischt und nach vorheriger Inkubation Mäusen injiziert wird. Aufgrund der auftretenden Todesraten werden im Vergleich zum WHO Standard die internationalen Einheiten/ml ermittelt. (Europ. Pharmacopoeia, 2nd Edition, Part II-2, p. 91-91-3, 1981).

Die Bestimmung des Gehalts an IgG Monomeren erfolgte mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography), indem die IgG-haltige Vergleichslösung einer HPLC-Analyse unterworfen wurde. Als Trennsäule fand eine Bio Sil TSK 250-Säule, 600 x 7,5 mm, für einen Molekulargewichtsbereich von 1.000 bis 300.000 Anwendung. Als Elutionsmittel wurde ein Natriumdehydrogenphosphat-Natriumsulfat-Puffer, pH 6,8, verwendet. Als Monomergehalt wurde der Peak mit Werten für V_e/V_o 1,28 - 1,67 herangezogen (T. Tomono et al., Analytical Biochemistry, 123: 394 - 401, 1982).

Beispiel 2:

Inaktivierung von Sindbisvirus mit immobilisiertem Trypsin.

10 ml einer in gleicher Weise wie in Beispiel 1 hergestellten Immunglobulin-G-haltigen Lösung wurden mit 1 ml immobilisiertem Trypsin und 0,5 ml einer Sindbisvirus Suspension (ATCC VR-68, Virusstamm AR 339, American Type Culture Collection) versetzt und unter sterilen Bedingungen bei 37°C unter Rühren behandelt. Als Vergleichslösung zur Aktivitätsbestimmung diente die gleiche Lösung wie in Beispiel 1.

Zu Beginn und nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Proben entnommen und der Virustiter bestimmt.

Die Ergebnisse sind aus Tabelle 2 zu ersehen: Nach 75 h ist der Sindbisvirustiter, ausgehend von 4,5 um 2,6 log Stufen auf 1,9 abgefallen. Die Gehalte an Tetanus Antikörpern und der IgG-Monomeren entsprechen jenen Werten, die in Tabelle 1 angegeben sind.

Beispiel 3:

Inaktivierung von HTLV-III_B (Human T Lymphotropic Virus III_B) mit immobilisiertem Trypsin.

10 ml einer in gleicher Weise wie in Beispiel 1 hergestellten Immunglobulin-G-haltigen Lösung wurde mit 1 ml immobilisiertem Trypsin und 0,5 ml einer HTLV-III_B-Suspension (R.C. Gallo et al, Science 224: 500 - 503, 1984) versetzt und unter sterilen Bedingungen bei 37°C unter Rühren behandelt. Zu Beginn und nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Proben entnommen und die Virus-Aktivität festgestellt. Die Bestimmung der Virusaktivität "Infektiöse Einheiten/0,5 ml" erfolgte nach der in der obigen Literaturstelle R. C. Gallo et al angegebenen Methode. Als Vergleichslösung zur biologischen Aktivitätsbestimmung diente eine Vergleichslösung wie in Beispiel 1.

Die Virus-Aktivitäten und der Anteil an IgG Monomeren in der Vergleichslösung wird aus Tabelle 3 ersichtlich: nach 48 h ist die Virus-Aktivität verschwunden, der IgG Monomerenanteil zum größten Teil erhalten.

Beispiel 4:

Inaktivierung von Vacciniavirus mit löslicher Hydrolase.

1 ml einer wie in Beispiel 1 hergestellten Immunglobulin-G-haltigen Lösung wurde mit 0,1 ml einer 7,5 %igen Hydrolaselösung (Trypsin-Pankreasprotease, Merck Artikel 8367) und mit 0,1 ml einer Vacciniavirussuspension (Vaccinia Virus, ATCC VR-862, Virusstamm Elstree, American Type Culture Collection) versetzt und unter sterilen Bedingungen bei 37°C behandelt. Eine Vergleichslösung aus 1 ml Immunglobulinlösung, 0,1 ml Hydrolaselösung und 0,1 ml virusfreiem Medium wurde vorbereitet und in gleicher Weise wie die virushaltige Lösung behandelt. Nach Probenahme zu verschiedenen Zeiten wurden der Virustiter, der Gehalt an Tetanusantikörpern und der Anteil der IgG Monomeren, wie beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 4 zu entnehmen. Nach 48 Stunden betrug der Virustiter weniger als 1 bei ausreichendem IgG-Monomeranteil.

Beispiel 5:

Inaktivierung von Sindbisvirus mit löslicher Hydrolase.

1 ml einer wie in Beispiel 1 hergestellten Immunglobulin-G-haltigen Lösung wurde mit 0,1 ml einer 7,5 %igen Hydrolaselösung (Trypsin-Pankreasprotease) und 0,1 ml einer Sindbisvirussuspension (ATCC VR-68, Virusstamm Elstree, American Type Culture Collection) versetzt und unter sterilen Bedingungen bei 37°C behandelt. Eine Vergleichslösung aus 1 ml Immunglobulinlösung, 0,1 ml Hydrolaselösung und 0,1 ml virusfreiem Medium wurde vorbereitet und in gleicher Weise wie die virushaltige Lösung behandelt. Nach Probenahme zu verschiedenen Zeiten wurden der Virustiter, der Gehalt an Tetanusantikörpern und der Anteil der IgG Monomeren, wie beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 5 zu entnehmen. Nach 48 h betrug der Virustiter weniger als 1 bei ausreichendem IgG Monomeranteil.

Beispiel 6:

Inaktivierung von HTLV-III_B mit löslicher Hydrolase.

1 ml einer wie in Beispiel 1 hergestellten Immunglobulin-G-hältigen Lösung wurde mit 0,1 ml einer 7,5 %igen Hydrolaselösung (Trypsin-Pankreaspräparat) und 0,1 ml einer HTLV-III_B Virussuspension (R.C. Gallo et al) versetzt und unter sterilen Bedingungen bei 37°C behandelt. Eine Vergleichslösung aus 1 ml Immunglobulinlösung, 0,1 ml Hydrolaselösung und 0,1 ml virusfreiem Medium wurde vorbereitet und in gleicher Weise wie die virushaltige Lösung behandelt. Nach Probenahme zu verschiedenen Zeiten wurden die Virus-Aktivität, die Tetanusantikörper und der Anteil der IgG Monomeren, wie beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 6 zu entnehmen. Nach 72 h war die Virus-Aktivität verschwunden, bei ausreichendem IgG Monomeranteil und zufriedenstellendem Antikörpergehalt.

Während die vorgenannten Beispiele die erreichbaren Inaktivierungsergebnisse unter Zugabe von bestimmten Modellviren erläutern, wird im Produktionsprozeß ohne Viruszugabe gearbeitet. Die Abtrennung des Inaktivierungsenzyms, was eine bevorzugte Ausführungsform darstellt, erfolgt hierbei nach der Rührstufe bei den angegebenen Temperaturen durch ausgewählte Maßnahmen, u.zw. z.B. bei Verwendung eines immobilisierten Enzyms durch Filtration und bei Verwendung eines löslichen Enzyms durch Adsorption an Ionenaustauscher oder Aluminiumhydroxid.

Tabelle 1

Behandlung mit immobilisiertem Trypsin nach	Virus Titer (log TCID ₅₀ /0,1 ml) Vacciniavirus	Tetanus Antikörper (IE/ml)	IgG Monomere (%)
vor Beginn der Behandlung	2,6	90	90,9
24 Stunden	1,0	80	82,2
48 Stunden	kleiner als 1,0	60	75,7
75 Stunden	kleiner als 1,0	52	69,4

/ Tabelle 2

Behandlung mit immobilisiertem Trypsin nach	Virus Titer (log TCID ₅₀ /0,1 ml) Sindbisvirus	Tetanus Antikörper (IE/ml)	IgG Monomere (%)
vor Beginn der Behandlung	4,5	90	90,9
24 Stunden	3,1	80	82,2
48 Stunden	2,5	60	75,7
75 Stunden	1,9	52	69,4

Tabelle 3

Behandlung mit immobilisiertem Trypsin nach	Virus Aktivität (Infektiöse Einheiten/0,5 ml) HTLV-III _B Virus	IgG Monomere (%)

vor Beginn der Behandlung	10 ⁶	89,4
1 Stunde	10 ⁴	89,9
24 Stunden	10 ⁰	90,8
48 Stunden	0	76,8
72 Stunden	0	71,2

/ Tabelle 4

Behandlung mit löslichen Hydrolasen nach	Virus Titer (log TCID ₅₀ /0,1 ml) Vaccinia Virus	Tetanus Antikörper (IE/ml)	IgG Monomere (%)
vor Beginn der Behandlung	2,1	90	82,9
5 Stunden	1,2	90	83,5
24 Stunden	1,0	70	66,1
48 Stunden	kleiner als 1,0	65	52,5
72 Stunden	kleiner als 1,0	55	41

/ Tabelle 5

Behandlung mit löslichen Hydrolasen nach	Virus Titer (log TCID ₅₀ /0,1 ml) Sindbisvirus	Tetanus Antikörper (IE/ml)	IgG Monomere (%)
vor Beginn der Behandlung	5,0	90	82,9
5 Stunden	4,5	90	83,5
24 Stunden	1,2	70	66,1
48 Stunden	kleiner als 1,0	65	52,5
72 Stunden	kleiner als 1,0	55	41

Tabelle 6

Behandlung mit löslichen Hydrolasen nach	Virus Aktivität (Inf.Einheit/0,5 ml) HTLV-III B	Tetanus Antikörper (IE/ml)	IgG Monomere (%)
vor Beginn der Behandlung	105	90	82,9
5 Stunden	104	90	83,5
24 Stunden	102	70	66,1
48 Stunden	101	65	52,5
72 Stunden	0	55	41

Patentansprüche

5 1. Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern in therapeutisch oder prophylaktisch anzuwendenden Immunglobulin-G-hältigen Fraktionen, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Lösung einer aus menschlichem Blut gewonnenen Immunglobulin-G-hältigen Fraktion bei einer Temperatur von 4 bis 50°C und bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,5 mit neutralen Hydrolasen behandelt wird.

10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als neutrale Hydrolase ein oder mehrere Enzyme aus der Gruppe der Peptidhydrolasen, wie Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Carboxypeptidasen, verwendet werden.

15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Inaktivierung das bzw. die Enzyme aus der Lösung abgetrennt und das behandelte Produkt einer weiteren Reinigung und Konzentrierung unterworfen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige Lösung der Immunglobulin-G-hältigen Fraktion mit einer löslichen Hydrolase bei einem pH-Wert von 6,0 bis 8,0 behandelt wird.

20 5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige Lösung der Immunglobulin-G-hältigen Fraktion mit einer an wasserunlöslichem Trägermaterial gebundenen (immobilisierten) neutralen Hydrolase bei einem pH-Wert von 5,5 bis 8,5 behandelt wird.

25 6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung der Immunglobulin-G-hältigen Fraktion bei erhöhter Temperatur während einer Dauer von 1 Stunde bis 36 Tage durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteinkonzentration der Immunglobulin-G-hältigen Fraktion von 0,1 bis 18 Gew.% beträgt.

30 8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserreger Hepatitisviren oder HTLV-III/LAV-Viren (Human T Lymphotropic Virus) sind.